



余蔓, 雷勇辉, 孙燕飞, 熊杰, 李杨. 马蜂内生酵母种群结构分析及 *Metschnikowia pulcherrima* 的分离和鉴定 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (5): 1288–1294.

马蜂内生酵母种群结构分析及 *Metschnikowia pulcherrima* 的分离和鉴定

余蔓¹, 雷勇辉², 孙燕飞¹, 熊杰¹, 李杨^{1*}

(1. 石河子大学生命科学学院, 新疆石河子 832003; 2. 石河子大学农学院, 新疆石河子 832003)

摘要: 本文以新疆石河子西公园的马蜂 *Vespa velutina* 为研究对象, 结合基于 26S rDNA 的高通量测序技术和稀释平板分离的方法, 研究马蜂内生酵母物种组成及其多样性。结果显示, 马蜂体内包含 *Cutaneotrichosporon*、*Torulaspora*、*Pichia* 等 10 个属内生酵母; 含有 *Cutaneotrichosporon cutaneum*、*Torulaspora delbrueckii*、*Sporidiobolales* sp. 等 10 种内生酵母。Shannon 指数、Simpson 指数、ACE 指数和 Chao1 指数分别为 0.619215、0.681265、84.38456 和 76。利用稀释平板分离方法分离获得一株内生酵母, 结合菌落和细胞形态观察、生理生化检测以及 26S rDNA 分子鉴定等方法, 该酵母菌株为美极梅奇酵母 *Metschnikowia pulcherrima*。本研究可为后续的内生酵母菌功能研究及酵母菌资源开发与利用奠定基础。

关键词: 马蜂; 内生酵母; 高通量测序; 26S rDNA

中图分类号: Q968.1; S476

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 05-1288-07

Population structure analysis of endophytic yeast of *Vespa velutina* and identification of *Metschnikowia pulcherrima*

YU Man¹, LEI Yong-Hui², SUN Yan-Fei¹, XIONG Jie¹, LI Yang^{1*} (1. College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; 2. Agricultural College of Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract: The composition and diversity of the endophytic yeast species in *Vespa velutina* Smith were studied by using high-throughput sequencing based on 26S rDNA and diluted plate method in Shihezi West Park, Xinjiang. The results showed that there were ten genus including *Cutaneotrichosporon*, *Torulaspora*, etc. There were ten species of endophytic yeast including *Cutaneotrichosporon cutaneum*, *Torulaspora delbrueckii*, *Sporidiobolales* sp., etc. Shannon index, Simpson index, ACE index and Chao 1 Index are 0.619215, 0.681265, 84.38456 and 76 respectively. A strain of endophytic yeast, *Metschnikowia pulcherrima*, was isolated by using diluted plate method combined with colony and cell morphology observation, physiological and biochemical detection and 26S rDNA molecular identification. This study can lay the foundation for subsequent study on endophytic yeast function and utilization of yeast resources.

Key words: *Vespa velutina*; endophytic yeast; high-throughput sequencing; 26S rDNA

基金项目: 国家自然科学基金 (31860003)

作者简介: 余蔓, 女, 1999 年生, 本科生, 研究方向为微生物资源, E-mail: 2508120379@qq.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 李杨, 男, 1974 年生, 博士, 讲师, 研究方向为微生物资源, E-mail: yglishzu@foxmail.com

收稿日期 Received: 2020-06-21; 接受日期 Accepted: 2020-08-26

昆虫体内栖息着一些特殊的内生微生物,在长期协同进化过程中,内生微生物有利于昆虫的适应与生存,还对昆虫的营养代谢、生长发育、生殖行为、免疫抗病等生命过程产生重要影响(王爱静等,2000,张振宇等,2017)。

昆虫内生酵母是昆虫内生微生物中的常见类群之一。近年来,在介壳虫等昆虫体内先后发现许多内生酵母新种(He *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016)。在东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 体内发现有掷孢酵母属 *Sporobolomyces* 和拟威尔嗜杀酵母属 *Cyberlindnera* (刘开平等,2018)。刺腿食蚜蝇 *Ischiodon scutellaris* Fabricius 体内含有的酵母种群也十分丰富(米桃桃等,2019)。这些昆虫内生酵母菌具有特殊的生理生化特性,例如褐飞虱 *Nilaparvum lugens* 体内含有一种酵母可将尿酸转化为氨基酸供给宿主昆虫营养(侯云等,2013),某些内生酵母还具有分解木聚糖的特性(Oliveira *et al.*, 2014)。

马蜂 *Vespa velutina* Smith 是一种广泛分布的群居社会性昆虫。马蜂主要以鳞翅目幼虫为食,因而可被应用于有效防治棉铃虫 *Helicoverpa armigera* Hübner 等农业害虫(李铁生,1987)。最近有研究报道马蜂肠道内含有可抑制反枝苋 *Amaranthus retroflexus* 的 11 种丝状真菌(张蕴等,2015)。然而,截止目前,关于马蜂内生酵母的种类组成及多样性研究,尚未见报道。本文以新疆石河子本地采集的马蜂为材料,通过高通量测序技术分析了马蜂内生酵母种群组成,并对菌株进行了分离纯化和初步鉴定。本研究将为马蜂内生酵母的生理功能研究及酵母菌资源开发和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 马蜂采集

2019 年 8 月在新疆石河子西公园草坪上,用捕虫网捕获得 30 头马蜂,将捕获的马蜂装入含乙醚的离心管中,带回实验室,冰箱保存备用。

1.2 培养基

(1) 马铃薯葡萄糖培养基: 马铃薯 20.0%, 葡萄糖 2.0%, 琼脂 2.0%, pH6.0 (玛依古丽·库尔班等,2015)。

(2) 生理生化培养基: 参照 2011 年《The Yeast: A taxonomic study》的方法配制碳源同化基

础培养基、糖类发酵基础培养基、尿素培养基、无维生素培养基(周新丽等,2011)。

1.3 实验方法

1.3.1 马蜂内生酵母高通量测序分析

挑选 30 头马蜂,浸泡在 75% 乙醇中 30 min,在超净工作台用无菌水冲洗 3 次,加适量无菌水,用研钵研磨成匀浆,滤纸片过滤,再用 0.45 μm 过滤膜真空抽滤,最后将滤膜送至美吉公司测序。通过 Illumina (MiSeq) 平台,以 NL-1、NL-2 测序引物进行 26S rDNA 高通量测序(Robnett *et al.*, 2013)。在 97% 的相似度下,利用软件 QIIME (v. 1.8.0) 统计样品中每个操作分类单位(operational taxonomic unit, OTU) 物种丰富度信息,并对测序结果进行 Alpha 多样性分析,其中包括 Shannon 多样性指数(Shannon diversity index)、Simpson 多样性指数(The Simpson index)、Chao1 丰富度估计指数(The Chao1 estimator)、ACE 丰富度估计指数(The ACE estimator)(焦晶凯等,2014)。

1.3.2 可培养酵母的分离纯化

将虫体研磨匀浆,吸取 1 mL 液体,按梯度稀释,取适当稀释度液体 100 μL 涂布于马铃薯葡萄糖培养基上,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2~3 d,挑取初步确认为酵母单菌落,平板划线纯化 2~3 次。将分离纯化的酵母菌株置 4 $^{\circ}\text{C}$ 斜面保藏。

1.3.3 菌株鉴定

(1) 观察菌株菌落和细胞形态,并参照 2011 年《The Yeast: A taxonomic study》进行生理生化指标测定(糖发酵、碳同化、无维生素培养试验等)。

(2) 菌株经液体培养后,收集菌体,采用 buffer 快速抽提法提取基因组 DNA(郭奕惠等,2006),以基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 26S rDNA 序列。PCR 扩增体系: ddH₂O 14.75 μL , 10 $\times$ Taq buffer 2 μL , dNTP 1.5 μL , MgCl₂ 1 μL , 上游引物 NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGG AAAAG-3') 1 μL , 下游引物 NL-4 (5'-GGTCCG TGTTCACAGACGG-3') 1 μL , 模板 DNA 2.5 μL , Taq 酶 0.25 μL 。PCR 条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 30 个循环。PCR 产物经凝胶电泳检测条带正确后,送至上海生工生物公司进行测序,将测序所得 26S rDNA 序列与 GenBank 中的序列进行比对,利用 MEGA-X 软件进行系统发育分析并构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 马蜂内生酵母高通量测序多样性分析及 Alpha 多样性分析

通过 Illumina (MiSeq) 平台对马蜂样品中提取的 DNA 进行 26S rDNA 高通量测序分析并优化, 通过 OTU 聚类分析, 真菌的 OTU 数分别为 11 个门、25 个纲、42 个目、49 个科、54 个属、60 个种, 未分类 2 个; 与 2011 年《The Yeast: A taxonomic study》和 GenBank 数据库新种对比后, 并进一步优化分类鉴定, 内生酵母含有 3 个门、6 个纲、7 个目、8 个科、10 个属、10 个种 (表 1, 表 2), 酵母类 OUT 数在真菌 OTU 总数的所占比例大于或等于 0.5%。

在属的水平上, *Cutaneotrichosporon* 为内生酵

母菌的优势属, 占 70.05%, 孢圆酵母属 *Torulaspora* 占 19.78%, *Sporidiobolales-unclassified* 占 5.88%, 毕赤酵母属 *Pichia* 占 1.34%, 而酵母菌属 *Saccharomyces*、*Pseudozyma*、拟威尔嗜杀酵母属 *Cyberlindnera*、黑粉菌属 *Filobasidium*、*Pleurostylic* 和金担子菌属 *Aureobasidium* 占比都小于 1%。

在种的水平上, 马蜂内生酵母共有 10 个种, 其中, *Cutaneotrichosporon cutaneum* 和 *Torulaspora delbrueckii* 及 *Sporidiobolales* sp. 为优势种, 所占比例依次为 54%、30% 和 9%, 其余 7 个种所占比例较小, 都小于 2% (表 3); 而 *Sporidiobolales* sp. 属于未鉴定的种, 很可能是一种酵母新种。总体上, 马蜂体内内生酵母种群组成多样, 且分布不均。

表 1 各 OTU 上酵母类群统计结果

Table 1 Statistical results of yeast groups on each OTU

样品 Sample	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species	未分类 Unclassified
马蜂 <i>Vespa velutina</i>	3	6	7	8	10	10	0

表 2 马蜂内生酵母类群属水平分布情况

Table 2 Distribution of endophytic yeast groups
genus in *Vespa velutina*

属 Genus	比例 (%) Proportion
<i>Cutaneotrichosporon</i>	70.05
<i>Torulaspora</i>	19.78
<i>Sporidiobolales-unclassified</i>	5.88
<i>Pichia</i>	1.34
<i>Saccharomyces</i>	0.80
<i>Pseudozyma</i>	0.54
<i>Cyberlindnera</i>	0.54
<i>Filobasidium</i>	0.53
<i>Pleurostylic</i>	0.27
<i>Aureobasidium</i>	0.27

表 3 马蜂内生酵母类群种水平分布情况

Table 3 Distribution of endophytic yeast groups
species in *Vespa velutina*

种 Species	比例 (%) Proportion
<i>Cutaneotrichosporon cutaneum</i>	70.05
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	19.78
<i>Sporidiobolales</i> sp.	5.88
<i>Pichia ethanolica</i>	1.34
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.80
<i>Pseudozyma prolifica</i>	0.54
<i>Cyberlindnera jadinii</i>	0.54
<i>Filobasidium magnum</i>	0.53
<i>Pleurostylic africana</i>	0.27
<i>Aureobasidium pullulans</i>	0.27

通过软件 QIIME (v. 1.8.0) 对样品进行 Alpha 多样性分析, 结果如表 4 所示。ACE 指数 84.38456, Chao1 指数 76, 表明马蜂内生酵母种群

多样性较高, 丰富度较大; Shannon 指数为 0.619215, Simpson 指数为 0.681265, 显示内生酵母种群均匀度适中。

表 4 马蜂内生菌群微生物多样性
Table 4 Microbial diversity of endophytic flora in *Vespa velutina*

样品 Sample	Shannon 多样性指数 Shannon diversity index	Simpson 多样性指数 Simpson index	Chao1 丰富度估计指数 Chao1 estimator	ACE 丰富度估计指数 ACE estimator
马蜂 <i>Vespa velutina</i>	0. 619215	0. 681265	76	84. 38456

2.2 可培养酵母菌株形态特征与生理生化特征

通过稀释平板分离纯化, 获得一株酵母菌, 命名为 MF-17 菌株, 经菌落、细胞形态特征观察, 菌株 MF-17 菌落红色圆形状奶油质地, 边缘整齐, 表面光滑湿润, 侧面凸起, 细胞大小为 5 ~ 10 μm, 细胞形态呈卵圆形, 无性生殖为单端芽殖 (图 1)。

菌株 MF-17 的糖类发酵及其它生理生化指检测结果如表 5 所示。在无维生素培养基上菌株 MF-17 不能生长; 菌株最高生长温度可达 40℃; 菌株因不产生尿素酶而不能分解利用尿素。糖发酵试验结果显示, 菌株 MF-17 可分解利用葡萄糖发酵产酸产气, 而在以乳糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉等 6 种糖为碳源的培养基中却不能产酸产气。

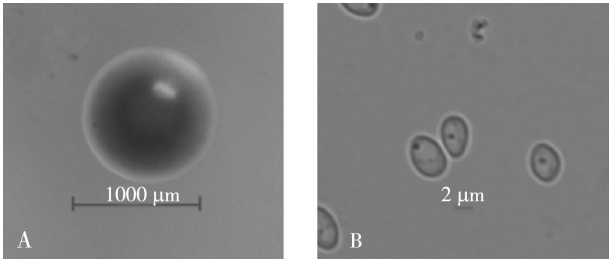


图 1 MF-17 菌株的菌落和细胞形态
Fig. 1 Colony and cell morphology of strain MF-17
注: A, MF-17 菌落形态图; B, MF-17 细胞形态图。Note: A, Colony morphology of MF-17; B, Cell morphology of MF-17 (A, bar = 1 000 μm; B, bar = 2 μm) .

表 5 MF-17 菌株生理生化测定结果
Table 5 Physiological and biochemical tests results of strain MF-17

菌株 Strain	葡萄糖 Glucose	棉子糖 D-Raffinose	D-麦芽糖 D-Maltose	蔗糖 Sucrose	D-半乳糖 D-Galactose	D-海藻糖 D-Trehalose	乳糖 Lactose	淀粉 Starch	无维生素 Vitamin-free	尿素酶 Urease	最高生长 温度 (℃) Maximum temperature
MF-17	+	-	-	-	W	-	-	-	-	-	40

注: +, 阳性反应, -, 阴性反应, W, 弱反应。表 6 同。Note: +, Positive; -, Negative; W, Weak. The same was true for Table 6.

碳源同化结果如表 6 所示, 在有氧条件下, 菌株 MF-17 可以利用半乳糖、麦芽糖、蔗糖、松三糖及甘油, 而不能利用鼠李糖、棉子糖和阿拉伯糖。在无氧发酵和有氧状态下, 菌株对麦芽糖、蔗糖的分解利用能力存在差异, 表明菌体在不同条件下对同一底物的分解利用可能存在多种不同的分解机制。对照菌种鉴定手册, 综合形态特征及生理生化特征检测结果, 初步鉴定菌株 MF-17

属于 *Metschnikowia*。
2.3 基于 26S rDNA D1/D2 区序列系统发育树分析

以 MF-17 菌株基因组 DNA 为模板, 以通用引物扩增 26S rDNA 的 D1/D2 区, 获得序列为 516 bp, 测序结果与 GenBank 数据库已知序列比对, 结果显示, MF-17 菌株与菌株 *Metschnikowia pulcherrima* (KY108494. 1) 序列同源性高达 98. 785 %。

表 6 MF-17 菌株碳源同化结果
Table 6 Carbon source assimilation of strain MF-17

菌株 Strain	葡萄糖 Glucose	D-棉子糖 D-Raffinose	D-麦芽糖 D-Maltose	蔗糖 Sucrose	D-半乳糖 D-Galactose	L-阿拉伯糖 L-Arabinose	L-鼠李糖 L-Ramnose	菊糖 Inulin	D-松三糖 D-Melezitose	甘油 Glycerol
MF-17	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+

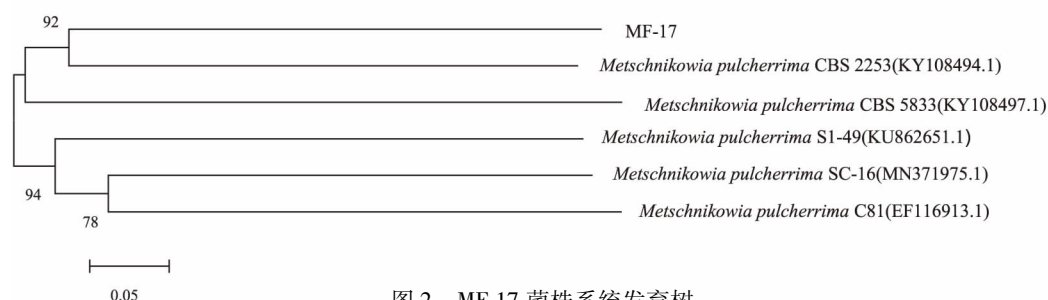


图2 MF-47 菌株系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain MF-47

利用 MEGA-X 构建系统发育树, 如图 2 所示, MF-47 菌株在系统发育树上与 *M. pulcherrima* (KY108494.1) 菌株处于同一进化分支, 与基于生理生化特征的鉴定结果基本相符。综合形态、生理生化特征及分子系统发育分析结果, 可确定菌株 MF-47 为 *M. pulcherrima*。

3 结论与讨论

迄今为止, 高通量测序技术是研究特定生境微生物群落组成及物种多样性的有效方法。本研究利用高通量测序技术测定新疆石河子的马蜂内生酵母种群组成及丰度, 内生酵母共 10 个属, 内生酵母种类组成多样, 但具体种属丰度相差较大。其中 *Cutaneotrichosporon* 为优势属, 占比 70.05%。此外, 在样品中测得一种未能鉴定到种的酵母 *Sporidiobolales* sp., 可能为潜在的酵母新种资源。

理论上, 通过稀释平板分离方法可分离昆虫体内的多数或部分内生酵母 (米桃桃等, 2019), 但本研究从马蜂体内未能分离获得高通量分析结果显示的酵母优势种。可能的原因是优势种内生酵母对昆虫体内环境依赖性较强, 在与自然生境条件明显不同的实验室培养条件下, 酵母菌不能离体生长 (廖丽花, 2018); 此外, 也可能因为内生酵母对营养、温度、pH、氧气等可能有复杂而特殊需求, 而用常规的 PDA 培养基分离方法不能获得酵母菌培养物; 再者, 内生酵母在离体培养条件下由于环境不适而生长缓慢, 导致在一定短时间内无法形成肉眼可见的单菌落, 因而可能被忽略。

本研究从马蜂体内分离了一株内生酵母 MF-47 菌株, 鉴定为 *M. pulcherrima*。菌株 MF-47 最高生长温度比对照菌株 *M. pulcherrima* (KY108494.1) 稍高, 可能与长期适应昆虫体内特殊环境有关。据研究报道, *M. pulcherrima* 属于一种非酿酒酵母,

分泌胞外酶能力强, 多附生于植物体表, 有拮抗植物病害的作用, 也是使酿酒增香或变质的因素 (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1998; Schena *et al.*, 2000; Spadaro *et al.*, 2002; Jolly *et al.*, 2006)。也有少数报道在昆虫或其它动物体分离到 *M. pulcherrima*, 例如, 果蝇体内也含有梅奇酵母属 *Metschnikowia*, 且两者有密切的联系, 利用这种关系可以研发引诱剂并参与到农业病虫害防治中 (Hamby, 2012)。本研究从马蜂体内也分离出了此属酵母, 后续可深入研究, 挖掘其在植物病虫害防治或果酒酿造方面可能的应用潜力。

然而, 平板分离获得的 *M. pulcherrima* 并不存于先前的高通量测序结果显示的 10 个酵母种之中。据推测, 在高通量测序时, 因 PCR 扩增过程的微量碱基错配, 高通量测序结果出现偏差, 可能导致某些酵母菌种未能检测到 (张帆等, 2019)。此外, 由于不同马蜂个体内生酵母种类存在差异或采样批次不同, 可能导致高通量测序样品和分离样品存在差异。其实, 平板分离纯化获得菌与高通量分析结果不一致的情况, 在其他类似研究也屡次被报道。最近有研究揭示在二月兰 *Orychophragmus violaceus*、龟甲饮片中分离真菌与高通量测序分析结果不尽相符 (张帆等, 2019, 肖博文等, 2020)。高通量测序分析法与平板分离法相结合, 才可能相对较全面准确地认识昆虫内生微生物种群构成及丰富度分布特点。严格地说, 由于本研究采集的马蜂样品有限, 实验结果虽然并不能全面准确地反映马蜂内生酵母的种群组成实际情况, 但在一定程度上, 也体现了马蜂内生酵母组成的多样性特点。本研究通过平板分离方法只分离得到的一株内生酵母菌株, 在后续研究中, 可考虑模拟内生菌自然生境条件, 通过对培养基、生长温度、pH 等条件优化, 有望分离到更多的内生酵母。

参考文献 (References)

- Esteve-Zarzoso B, Manzanares P, Daniel Ramón, *et al.* The role of non-Saccharomyces yeasts in industrial winemaking [J]. *International Microbiology*, 1998, 1 (2): 143–8.
- Fang X, Shen J, Wang YJ, *et al.* Isolation and identification of endophytic actinomycetes from medical insects (*Periplaneta americana*) [J]. *Journal of Parasitic Biology*, 2016, 11 (6): 550–553, 565. [方霞, 沈娟, 王赢姣, 等. 药用昆虫美洲大蠊内生放线菌的分离和鉴定 [J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11 (6): 550–553, 565]
- Guo YH, Huuag GJ, Yu DH. DNA extraction of the pearl oyster *Pinctada fucata* and optimization of RADP conditions [J]. *South China Fisheries Science*, 2006, 2 (4): 59–64. [郭奕惠, 黄桂菊, 喻达辉. 合浦珠母贝 DNA 的抽提和 RAPD 反应体系的优化 [J]. 南方水产, 2006, 2 (4): 59–64]
- He F, Lin B, Sun J, *et al.* *Knufia aspidiotus* sp. nov., a new black yeast from scale insects [J]. *Phytotaxa*, 2013, 135 (1): 39–50.
- Hamby KA, Leon AH, Boundmills K, *et al.* Yeast associations of spotted wing drosophila (*Drosophila suzukii*, Diptera: Drosophilidae) in cherries and raspberries [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, 78: 4869–4873.
- Hou Y. Diversity of Yeast-like Symbiotes (YSL) in Brown Planthopper and its Variation in Different Nymph Periods and on Different Resistant Rice [D]. Hangzhou: China Jiliang University, 2013. [侯云. 褐飞虱体内类酵母共生菌的多样性及其在不同虫龄和不同抗性水稻上的变化规律 [D]. 杭州: 中国计量学院, 2013]
- Jolly N, Augustyn O, Pretorius I. The role and use of non-saccharomyces yeasts in wine production [J]. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 2006, 27 (10): 15–39.
- Kurtaman CP, Fell JW. The Yeast: A Taxonomic Study (Fifth Edition) [M]. Amsterdam New York: Elsevier Science and Technology, 2011.
- Kurban M, Abdurusul M, Abdurahman M, *et al.* Selection of excellent yeast for Nang Dough in Xinjiang [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015, 17: 302–305, 309. [玛依古丽·库尔班, 米尔班古丽·阿卜杜如苏力, 麦合甫再木·阿不都热合曼, 等. 新疆地方特色饅头团优良酵母菌的筛选 [J]. 安徽农业科学, 2015, 17: 302–305, 309]
- Li TS, He JG. Hornets were used to control cotton pests [J]. *Bulletin of Agricultural Science and Technology*, 1980, 6: 32. [李铁生, 贺建国. 利用马蜂防治棉花害虫 [J]. 农业科技通讯, 1980, 6: 32]
- Liao LH. Effect of Microaerobic Condition on Bacterial Isolation and Evaluation Cultivability of Microorganisms Based on High-Throughput Sequencing [D]. Xiamen: Xiamen University, 2018. [廖丽花. 微氧条件对细菌分离得影响及基于高通量测序技术对微生物可培养性得评估研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2018]
- Liu KP, Wei YM, Xiong J, *et al.* Analysis of diversity of endobiotic yeasts isolated from *Locusta migratoria manilensis* and *Ischiodon scutellaris* Fabricius [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2018, 45 (9): 90–95. [刘开平, 韦玉梅, 熊杰, 等. 东亚飞蝗和刺腿食蚜蝇内生酵母菌多样性分析 [J]. 广东农业科学, 2018, 45 (9): 90–95]
- Liu XJ, Wang Y, Ren YC, *et al.* *Wickerhamiella brachini* f. a., sp. nov., *Wickerhamiella pterostichi* f. a., sp. nov., three yeast species isolated from insects [J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2016, 66 (10): 3995.
- Mi TT, Feng L, Wang C, *et al.* Analysis of the population structure of endophytic yeast of *Ischiodon scutellaris* Fabricius in Xinjiang using high throughput sequencing combined with culturing technologies [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2019, 41 (4): 829–836. [米桃桃, 冯丽, 王翀, 等. 高通量测序结合可培养技术分析新疆刺腿食蚜蝇内生酵母菌的种群结构 [J]. 环境昆虫学报, 2019, 41 (4): 829–836]
- Miao XX, Ding DC. Interaction between aphids and its intracellular bacterial symbionts *Buchnera* [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2003, 15 (4): 242–247. [苗雪霞, 丁德诚. 蚜虫与其胞内共生细菌的相互作用 [J]. 生命科学, 2003, 15 (4): 242–247]
- Oliveira JV, Borges TA, Ra CDS, *et al.* *Pseudozyma brasiliensis* sp. nov., a xylanolytic, ustilaginomycetous yeast species isolated from an insect pest of sugarcane roots [J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2014, 64 (6): 2159.
- Robnett, Christie J, Kurtzman, *et al.* Relationships among genera of the Saccharomycotina (*Ascomycota*) from multigene phylogenetic analysis of type species [J]. *FEMS Yeast Research*, 2013, 13 (1): 23–33.
- Ren YC, Liu ST, Li Y, *et al.* *Pichia dushanensis* sp. nov. and *Hyphopichia paragotoi* sp. nov., two sexual yeast species associated with insects and rotten wood [J]. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2015, 65 (9): 2875–2881.
- Schena L, Ippolito A, Zahavi T, *et al.* Molecular approaches to assist the screening and monitoring of postharvest biological yeasts [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2000, 106: 681–691.
- Spadaro D, Vola R, Piano S, *et al.* Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples [J]. *Postharvest Biology & Technology*, 2002, 24 (2): 123–134.
- Wang AJ, Chen JM, Liu HG, *et al.* Protection and utilization of insect resources in Xinjiang [J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2000, S1: 183. [王爱静, 陈静梅, 刘宏光, 等. 新疆资源昆虫的保护和利用 [J]. 新疆农业科学, 2000, S1: 183]
- Xiao BW, Yu SY, Feng W, *et al.* Isolation and identification of seed borne fungi on *Orychophragmus violaceus* [J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2020, 28 (2): 338–349. [肖博文, 于丝雨, 冯伟, 等. 二月兰种带真菌分离与鉴定 [J]. 草地学报, 2020, 28 (2): 338–349]
- Xiang HJ, Cai PM, Ji QE, *et al.* A review on identification methods for symbiotic bacteria in insects [J]. *Journal of Shangdong Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2018,

- 49 (4): 142–149. [向侯军, 蔡普默, 季清娥, 等. 昆虫体内共生菌鉴定方法的研究进展 [J]. 山东农业大学学报 (自然科学版), 2018, 49 (4): 142–149]
- Zhang F, Li HX, Xu Q, *et al.* Species and diversity of fungi on surface of tortoiseshell decocting pieces: A study based on high-throughput sequencing and plate method [J]. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 42 (1): 63–68. [张帆, 李红霞, 徐清, 等. 基于高通量测序法及平板法研究龟甲饮片表面真菌种类及其多样性 [J]. 北京中医药大学学报, 2019, 42 (1): 63–68]
- Zhou XL, Li ZY, Yang LY, *et al.* Identification of yeasts isolated from Chenghai Lake, a plateau lake in Yunnan Province [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 4: 547–553. [周新丽, 李治滢, 杨丽源, 等. 云南程海湖酵母菌多样性及应用 [J]. 微生物学报, 2011, 4: 547–553]
- Zhang Y, Shao MW, Zhang YL, *et al.* Inhibition of *Amaranthus retroflexus* by wasp gut fungal isolate *Fusarium oxysporum* MF06 [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55 (3): 292–298. [张蕴, 邵明伟, 张应烙, 等. 马蜂肠道菌抑制反枝苋的活性筛选及菌株 MF06 的活性代谢产物 [J]. 微生物学报, 2015, 55 (3): 292–298]
- Zhang ZY, Sheng P, Huang SW, *et al.* Diversity, function and application of insect gut microbiota [J]. *Amino Acids and Biotic Resources*, 2017, 39 (4): 231–239. [张振宇, 圣平, 黄胜威, 等. 昆虫肠道微生物的多样性、功能及应用 [J]. 氨基酸和生物资源, 2017, 39 (4): 231–239]